



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Immunmedierad trombocytopeni hos hund

Emelie Johansson



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014:73

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Immunmedierad trombocytopeni hos hund

Canine Immune-Mediated Thrombocytopenia

Emelie Johansson

Handledare:

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2014

Omslagsbild: Emelie Johansson

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014:73
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Immunmedierad trombocytopeni, hund, trombocytbundna antikroppar, antinukleära antikroppar, idiopatisk trombocytopen purpura

Key words: Immune-mediated thrombocytopenia, dog, canine, anti-platelet antibodies, antinuclear antibodies, idiopathic thrombocytopenic purpura

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Summary.....	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	4
Litteraturoversikt	4
Trombocyts roll i hemostasen.....	4
Indelningar av sjukdomen immunmedierad trombocytopeni.....	4
Autoimmunitet.....	4
Trombocytbundna antikroppar	5
Detektion av trombocytbundna antikroppar	5
Trombocytbundna antikroppar och trombocytantal	6
Trombocytbundna antikroppar och symptom	6
Behandling.....	7
Glukokortikoiders immunosupprimerande effekt	7
Behandling och trombocytbundna antikroppar	7
Antinukleära antikroppar.....	7
Antinukleära antikroppar och systemisk lupus erythematosus	7
Antinukleära antikroppar och immunmedierad trombocytopeni	8
Cytotoxicitet	8
Komplementkaskaden.....	9
Diskussion	9
Litteraturförteckning.....	11

SAMMANFATTNING

Immunmedierad trombocytopeni (IMT) är en vanlig rubbning i primära hemostasen och uppstår som en konsekvens av för tidig destruktion av trombocyter (blodplättar). Denna destruktion beror på en ökad produktion av trombocytbundna antikroppar (platelet-bound antibodies, PBA) som binder in till antigen i trombocytväggen. Antikroppsproduktionen, som är en immunologisk process, kan dels uppstå spontant genom en autoimmun reaktion (primär IMT), eller triggas av infektioner eller neoplasier (sekundär IMT). Diagnosticering av IMT, och då syftas framför allt på primär IMT, sker främst utifrån uteslutande av andra bakomliggande orsaker, då en specifik diagnostisk metod inte finns tillgänglig. Tester för att påvisa PBA finns, men deras betydelse för både diagnostik och prognos har länge varit oklar. Denna uppsats syftar till att sammanfatta forskning som finns tillgänglig om betydelsen av påvisande av PBA vid IMT, men även forskning kring den immunologiska bakgrunden till sjukdomen. En stor del av kunskapen kring primär IMT hos hund är hämtad från humanstudier, då den kroniska formen hos människa (idiopatisk trombocytopen purpura, ITP) liknar sjukdomsförloppet vid IMT hos hund. Denna uppsats behandlar även antinukleära antikroppar (ANA), som främst kopplas till systemisk lupus erythematosus (SLE), men där kopplingar till primär IMT hos hund samt ITP hos människa även har studerats. Många studier har undersökt både betydelsen av PBA och betydelsen av ANA för sjukdomen. Resultaten är dock inte överensstämmande. Att det finns koppling mellan påvisande av PBA och primär IMT är tydligt, men däremot finns inte tillräckligt specifika tester tillgängliga för att dessa ska kunna användas vid diagnostik. Detsamma gäller tester för påvisning av ANA. När det gäller ANA är även kopplingen till själva sjukdomen mer oklar. Då trombocytopeni är ett symptom vid SLE har det undersökts om trombocytopeni i samband med detekterbara ANA innebär en ökad risk för utveckling av SLE i framtiden. Även i dessa studier går resultaten isär. I studier som undersökt huruvida påvisande av antikroppar, både PBA och ANA, är kopplat till ett sämre behandlingssvar är resultaten dock mer överensstämmande att så är fallet. Här är författarna eniga om att kopplingar till primär IMT/ITP mellan både PBA och ANA är starkt misstänkta, men att mer forskning är nödvändig och att framtagande av mer specifika testningsmetoder är att önska för att kunna utvärdera kopplingarna bättre.

SUMMARY

Immune-mediated thrombocytopenia (IMT) is a common malfunction in the primary hemostasis and is developed as a consequence of a premature destruction of platelets. This destruction is caused by an excessive production of platelet-bound antibodies (PBA) that bind to antigens in the wall of the platelet. The antibody production, which is an immunologic process, can develop spontaneous by an autoimmune reaction (primary IMT) or it can be triggered by infections or neoplasias (secondary IMT). Detection of IMT, and first and foremost primary IMT, is mainly based on exclusion of other underlying causes, since a specific diagnostic method is not available. Tests to detect PBA are available, but their significance in both diagnostic and prognostic purposes has been unclear for a long time. The purpose of this paper is to summarize available research on the significance of PBA in IMT, and research on the immunologic background of the disease. A large part of the knowledge around canine primary IMT is collected from human studies, because the chronic form of the disease in humans (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) is similar to the course of the disease in canine IMT. This paper also discusses antinuclear antibodies (ANA), that first and foremost are associated with systemic lupus erythematosus (SLE), but their connections to canine primary IMT and human ITP have also been studied. Many studies have been investigating both the significance of PBA and the significance of ANA for the disease, but with diverging results. It is clear that a connection between detecting PBA and primary IMT is present, but on the other hand there is not enough specific tests available for these to be used for a diagnostic purpose. The same goes for tests available for detecting ANA. When it comes to ANA the connection to the disease is even more unclear. Since thrombocytopenia is a symptom for SLE, it has been investigated if thrombocytopenia together with detectable ANA means an increased risk for developing SLE in the future. The results in these studies do not agree either. Studies investigating whether detection of antibodies, both PBA and ANA, is related to a worse response to treatment conclusively show that so is the case. The authors are in these studies in agreement that the connections to primary IMT/ITP between both PBA and ANA are strongly suspected, but that more research is necessary and that development of more specific test methods is wanted for being able to evaluate these connections more thoroughly.

INLEDNING

Immunmedierad trombocytopeni (IMT) är en vanlig rubbning i den primära hemostasen och den vanligaste orsaken till spontan blödning hos hund (Mackin, 1995). IMT uppstår som en konsekvens av för tidig destruktion av trombocyter (blodplättar). Destruktionen orsakas av en ökad antikroppsbindning till glykoproteiner (GP) i trombocytens membran. Makrofager har membranbundna Fc-receptorer på cellytan som binder in till den konstanta delen (Fc) på antikropparna (immunoglobuliner). Denna bindning initierar destruktion av trombocyter (Mackin, 1995, Lewis & Meyers, 1996)

Megakaryocyt är den celltyp som genom fragmentering producerar kärnfria trombocyter. En ökad nedbrytning av trombocyter leder till en ökad trombopoies och en ökad mängd cirkulerande megakaryocyter. När hastigheten i destruktion av trombocyter överstiger hastigheten av kompensatorisk trombocytoproduktion av megakaryocyter uppstår trombocytopeni (Mackin, 1995).

Hundar som drabbas av IMT har en medelålder på sex år, men sjukdomen finns rapporterad hos hundar i ålder från åtta månader upp till 15 år. Raser som Cocker spaniel, schäfer, Old English Sheepdog och pudel är predisponerade, men alla raser kan drabbas. Undersökningar har även visat att tikar oftare drabbas av IMT än hanhundar, och att denna orsak skulle vara hormonberoende (Lewis & Meyers, 1996, Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger, 2009). Dircks, Schuberth & Mischke (2009) fann dock att både intakta tikar och hanhundar var mer benägna att drabbas av IMT än kastrerade hundar av bägge kön. Bland hundar som uppvisar trombocytopenisk blodbild är prevalensen av IMT cirka 5 % (Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger, 2009).

De kliniska symptom som främst ses vid IMT är petechier och echymoser samt blödningar från mukosa ytor i mun, näshåla, mag-tarmkanal och urinvägar. Referensvärdet för en trombocytopenisk blodbild är $<150\ 000/\mu\text{l}$. Förutsatt att de trombocyter som finns fungerar normalt är det mycket ovanligt med spontana blödningar om trombocytantalet är över $50\ 000/\mu\text{l}$. (Mackin, 1995, Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger, 2009, Davidow et al., 2012). Vid IMT är trombocytopeni ofta det enda onormala i blodbilden, men vid blödning kan det även föreligga en anemi (Putsche & Kohn, 2008).

IMT kan vara primär eller sekundär. En sekundär IMT kan uppkomma genom att exempelvis en infektion eller neoplasmi utlöser produktion av antikroppar, medan en primär IMT uppkommer spontant och innebär en produktion av autoimmuna antikroppar. Diagnostiken vid primär IMT innebär främst att utesluta bakomliggande orsaker till trombocytopenin. Testmetoder för att detektera antikroppar finns tillgängliga, men deras betydelse är oklar. Denna uppsats syftar främst till att sammanfatta forskning kring betydelsen av dessa trombocytbundna antikroppar (platelet-bound antibodies, PBA) vid diagnostik av primär IMT samt den immunologiska bakgrunden till sjukdomen. Forskning kring antinukleära antikroppar (ANA), som främst förknippas med den systemiskt autoimmuna sjukdomen systemisk lupus erythematosus (SLE), och deras koppling till primär IMT finns också tillgänglig, och denna uppsats behandlar även detta.

MATERIAL OCH METODER

Litteratur till denna uppsats har hämtats genom sökningar framförallt på databasen *Web of Science*. Sökord som använts är "immune-mediated thrombocytopenia" OR "autoimmune thrombocytopenia" OR "immune thrombocytopenic purpura" samt "canine" OR "dog" OR "dogs". Referenslistorna till de artiklar som hittats med hjälp av dessa sökord har använts för att finna ytterligare information.

LITTERATURÖVERSIKT

Trombocyters roll i hemostasen

Trombocyter är nödvändiga för en normalt fungerande hemostas och deras främsta roll är att bilda den initiala pluggen som täcker och förseglar en endotelskada. Vid skada binder trombocyter till subendotelialt matrix och blir då aktiverade, vilket innebär att de ändrar form, utsöndrar tromboxan A₂ och adenosindifosfat (ADP) samt att de uttrycker receptorer. ADP triggar bindningen av fibrinogen till trombocyters receptorer glykoprotein (GP) IIb och IIIa. Detta leder till formationen av fibrinogenbroar som länkar samman trombocyter till ett löst aggregat, som vid trombocytkontraktion sedan bildar en tät plugg.

Indelningar av sjukdomen immunmedierad trombocytopeni

Som tidigare nämnts kan IMT vara primär eller sekundär. Primär IMT definieras som trombocytopeni utan känd bakomliggande orsak, och är en spontan autoimmun sjukdom där autoantikroppar bildas. Olika infektioner och neoplasier kan också utlösa produktion av antikroppar via immunologiska mekanismer som molekyllär mimicry eller via induktion eller förändring av värdantigener, vilket kan leda till en sekundär IMT. De mest erkända exemplen på infektioner som kan trigga denna produktion hos hund är sjukdomar som *Anaplasma* och *Leishmania*. Trombocytopeni kan dock orsakas av olika infektioner och neoplasier utan att någon immunologisk mekanism föreligger, till exempel vid defekta bildningar i benmärgen och splenomegali (Mackin, 1995, Lewis & Meyers, 1996, Whitley & Day, 2011).

Primär IMT hos människa delas in i en akut och en kronisk form. Akut IMT drabbar patienter i ung ålder, är typiskt övergående och ger oftast milda symptom. Kronisk primär IMT brukar benämnas kronisk idiopatisk trombocytopen purpura (ITP). ITP utvecklas i vuxen ålder och ger vanligen mer allvarliga symptom än den akuta formen, dessutom är recidiv vanligt. ITP är den form av sjukdomen som i sjukdomsförlopp mest liknar primär IMT hos hund och därför används ofta resultat från humana studier för ITP för att förklara primär IMT hos hund. Milda fall hos hund som mer liknar akut primär IMT hos människa har dock även rapporterats (Mackin, 1995, Lewis & Meyers, 1996).

Autoimmunitet

De cellulära störningarna i immunsystemet vid autoimmun uppkomst av trombocytopeni beror på avvikelser hos ett flertal celltyper, inkluderande T- och B-lymfocyter, monocyter, makrofager, natural killer (NK)-celler och dendritiska celler (Liu, Hou & Peng, 2013). T-lymfocyter innefattar CD4⁺ T-hjälparceller (Th-celler), CD8⁺ T-celler (cytotoxiska T-celler)

och T-regulatoriska (Treg) celler. Th1- och Th2-celler har ett gemensamt förstadium i Th0-cellen. Utvecklingen från Th0-cell är beroende av signaler från antigenpresenterande celler (APC) (Whitley & Day, 2011).

Autoimmunitet involverar immunologiska förändringar som kan innefatta avsaknad av Treg-effekt parallellt med en felaktig presentation av autoantigen av APC. Detta tillåter en ökad aktivering av Th1-celler vid autoimmuna sjukdomar som involverar cytotoxisk destruktion av målvävnad eller av Th2-celler vid autoimmuna sjukdomar som involverar produktion av autoantikroppar. Ett Th2-svar är det som främst förknippas med IMT (Whitley & Day, 2011), men forskning har även visat att ett Th1-svar och cytotoxicitet kan kopplas till IMT (Olsson et al., 2003). Också komplement har misstänkts ha en del i trombocytdestruktion vid IMT (Whitley & Day, 2011).

Trombocytbundna antikroppar

Antikropparna som bildas vid IMT tillhör framför allt immunoglobulin G-klassen (IgG) och är främst riktade mot GP IIb och IIIa i trombocytenns membran. PBA kan detekteras bundna till trombocyter eller till megakaryocyter, men kan även detekteras cirkulerande i plasma innan de hunnit binda (Lewis & Meyers, 1996). Trombocyter som är beklädda med PBA fagocyteras av makrofager via Fc-receptorer och destrueras för tidigt i retikuloendoteliala systemet, framför allt i mjälten. Produktionen av PBA kontrolleras av trombocyt-specifika Th2-celler (Semple & Provan, 2012).

Även vid kronisk ITP hos människa tillhör PBA vanligen IgG-klassen, men här har även IgM och IgA detekterats. Trombocytbundna IgG-nivåer ökar hos de flesta ITP-patienter och är omvänt korrelerande med trombocytantalet. Däremot har ingen konsekvent korrelation mellan trombocytantal och trombocytbundna IgM- eller IgA-nivåer detekterats. GP IIb och IIIa har även vid ITP identifierats som de antigena strukturer antikropparna känner igen, men man har här även sett att PBA kan vara riktade mot GP Ib och IX, vilket ännu inte har setts hos hund (Mackin, 1995, Kiefel et al., 1996, Lewis & Meyers, 1996, Liu, Hou & Peng, 2013).

Tidiga studier har visat att PBA är sjukdomsspecifika för primär IMT/ITP (Berchtold & Wenger, 1993, Dircks, Schuberth & Mischke, 2009) medan senare studier pekar på att så inte är fallet (Lo & Deane, 2014). Den kliniska och patogenetiska betydelsen av PBA vid primär IMT/ITP har dock länge varit okänd (Berchtold & Wenger, 1993), men det är numera välkänt att PBA är betydelsefulla i sjukdomens patogenes (Lo & Deane, 2014).

Detektion av trombocytbundna antikroppar

Det finns inga diagnostiska tester för att konfirmera IMT/ITP (Neunert, 2011), men det finns tester för att detektera PBA (Dircks, Schuberth & Mischke, 2009). Dessa testar för trombocytbundna IgG (direkt test) och för cirkulerande IgG i serum som är bindningsbenägna till trombocyter (indirekt test). Indirekt test har generellt låg sensitivitet och används därför sällan inom varken human- eller veterinärvården. Direkt test har oftast högre sensitivitet och är därför mer användbart. Antikropparnas specificitet vid IMT/ITP kan vara heterogen och vanligen kan autoantikroppar mot flera trombocytantigen identifieras, så användningen av

dessa tester är inte heller generellt utbredd (Dircks, Schuberth & Mischke, 2009, Lo & Deane, 2014).

Viss forskning tyder på att ett negativt direkt test, det vill säga att inga PBA har kunnat detekteras, nästan alltid utesluter en primär IMT (Lewis & Meyers, 1996, Dircks, Schuberth & Mischke, 2009), medan andra studiers resultat pekar på att så inte är fallet (Lo & Deane, 2014).

Trombocytbundna antikroppar och trombocytantal

Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger (2009) utförde en retrospektiv studie där 871 hundar med trombocytopeni ingick. Här undersöktes om trombocytantalet hos hundar med IMT skiljde sig från trombocytantalet hos hundar med trombocytopeni där bakomliggande orsak fanns. Resultaten visade att hundarna med IMT hade signifikant lägre trombocytantal än hundarna med trombocytopeni med känd bakomliggande orsak, som exempelvis neoplasia eller infektion. Hos hundar med IMT såg man även en högre prevalens av anemi tillsammans med trombocytopenin.

En annan hundstudie utförd på 83 hundar undersökte bakomliggande sjukdomar och klinikopatologiska faktorer hos trombocytopeniska hundar utifrån om PBA kunde detekteras eller inte. Resultaten visade att hos de 37 hundar där PBA påvisades var trombocytantalen signifikant lägre än hos de hundar där PBA inte kunnat detekteras. Av dessa 37 hundar misstänktes att 13 hade primär IMT då inga bakomliggande orsaker kunde hittas. En av de hundar som misstänktes för primär IMT testade negativt för PBA (Dircks, Schuberth & Mischke, 2009).

I en humanstudie utförd på 58 patienter med aktiv ITP och 26 patienter med ITP i regression mättes autoantikroppar mot GPIIb/IIIa och Ib/IX. Av de 58 patienterna med aktiv ITP var PBA mätbara hos 53 av patienterna. Bland patienterna med ITP på tillbakagång var PBA endast mätbara hos två av dem. Cirkulerande PBA mättes också, 29,3 % av patienterna med aktiv ITP hade mätbara cirkulerande autoantikroppar, men inga cirkulerande autoantikroppar kunde detekteras hos patienter med ITP på tillbakagång. Resultaten i denna studie visade även att antikropparna försvann eller minskade betydligt vid regression och att de återigen steg hos recidiverande patienter. Inga trombocytbundna antikroppar hittades hos friska donatorer eller hos patienter med icke immunmedierad trombocytopeni (Berchtold & Wenger, 1993).

Trombocytbundna antikroppar och symptom

Förutom samband mellan detektion av PBA och IMT i sig har studier även utförts där samband mellan påvisande av antikroppar och allvarligheten i symptom vid klinisk sjukdom har undersökts. Hos människor med ITP har det visats att patienter som testat positivt för PBA haft mer allvarliga blödningar än de som testat negativt. Hos de som testade positivt sågs även utveckling av kronisk ITP i högre grad jämfört med negativt testade patienter (Grimaldi et al., 2014). Studier har även visat att patienter med ITP där PBA har påvisats mer frekvent och även snabbare uppvisar en klinisk försämring (Fabris et al., 2004). Sikorska, Konopka & Maslanka (2008) fann en högre frekvens av PBA hos patienter med kronisk ITP i

jämförelse med patienter med akut primär IMT samt att kronisk sjukdom mer frekvent utvecklades hos patienter med påvisade antikroppar.

Behandling

Behandling vid IMT är främst immunosupprimerande, och då framför allt glukokortikoider. Vid utsättning av behandling är dock risken för recidiv stor, cirka 40 %. Livshotande blödningar är ovanligt vid IMT, men i dessa fall ges blodtransfusioner. Trombocyterna i transfusionerna förstörs dock snabbt och därför behövs upprepade enheter (Lewis, 1996). Vid allvarliga fall av IMT då glukokortikoider och blodtransfusioner inte räcker till är sista alternativet cytostatika.

Glukokortikoiders immunosupprimerande effekt

Glukokortikoidernas verkan leder till stabilisering av cellmembran på granulocyter, mastceller och monocyter/makrofager samt ger en hämning av fosfolipas A₂, vilket förhindrar frisättning av arakidonsyrametaboliter i cyklooxygenas och lipoxygenas signalvägar. Även frisättningen av cytokinerna IL-1 och IL-6 hämmas. Glukokortikoiderna har också effekt på komplement genom att minska mängden C3 och ger även en snabb nedreglering av Fc-receptor-uttryck på makrofager. Detta reducerar fagocytos av opsoniserade röda blodkroppar och blodplättar, vilket kan förklara mycket av den rapporterade tidiga effekten av glukokortikoider vid IMT (Al-Ghazlat, 2009, Whitley & Day, 2011).

Behandling och trombocytbundna antikroppar

Tolv patienter med aktiv ITP följdes under immunosupprimerande behandling med kortikosteroider. Åtta av dessa svarade med normaliserat trombocytantal (>150 000/μl), och hos dessa sågs parallellt med trombocytökningen en minskning i PBA. Två patienter som först svarade på behandling men som sedan fick återfall vid avslutande behandling fick åter detekterbara antikroppar vid recidiv. Hos de fyra patienter som inte visade någon signifikant ökning i trombocytantal höll sig antikropparna på ungefär samma nivå hela tiden (Berchtold & Wenger, 1993).

Antinukleära antikroppar

ANA är antikroppar som binder till proteiner (och DNA) i cellkärnan. Test för detektion av ANA (ANA-test) används idag vid diagnosticering SLE inom både human- och djursjukvård. Vanliga symptom vid SLE är polyartrit, anemi, glomeruliefrit, dermatopati och även trombocytopeni (Smee, Harkin & Wilkerson, 2007).

Antinukleära antikroppar och systemisk lupus erythematosus

Smee, Harkin & Wilkerson (2007) undersökte koncentrationen av ANA i blodet (ANA-titer) på 120 hundar med SLE och SLE-relaterade symptom. De delades in i grupper utifrån ANA-titer och antal framträdande SLE-relaterade symptom. Av de 18 hundar i undersökningen som diagnosticerades med SLE hade fyra en ANA-titer på 1:160, tre på 1:320 och elva på > 1:640. Ingen av dessa hade en titer som var < 1:160. Elva av de tolv hundar som hade titer över 640 diagnosticerades med SLE. Däremot sågs att ANA-test inte var användbart

diagnostiskt hos hundar utan några utmärkande SLE-relaterade symptom, då många hundar som helt saknade sådana symptom testade positivt. Vid redan konstaterade symptom sågs dock att ANA-titer och allvarlighetsgrad korrelerade.

Antinukleära antikroppar och immunmedierad trombocytopeni

Även kopplingen mellan ANA-titer och ITP har undersökts i ett flertal humana studier (Zimmerman & Ware, 1997, Abbasi, Milhem & Zaru, 2008, Demir et al., 2011). Zimmerman & Ware (1997) fann att det hos barn som tidigt utvecklade ITP och testade positivt på ANA-test även sågs en ökad risk för utveckling av ITP. Det sågs också hos dessa patienter en ökad risk för utveckling av systemiska autoimmuna sjukdomar samt sämre respons på vissa behandlingar för sin ITP. Abbasi, Milhem & Zaru (2008) testade patienter med ITP för ANA och jämförde deras trombocytnivåer före insatt behandling med trombocytnivåerna efter två veckors behandling med kortikosteroider. De fann då en signifikant lägre respons på behandlingen hos de patienter där ANA kunnat påvisas, då det visades att trombocytnivåerna generellt inte hade stigit alls lika mycket hos dessa patienter som hos de som testade negativt för ANA.

I flera studier har det även visats att patienter med ITP som testar positivt för ANA i högre grad utvecklar SLE senare i livet (Perez, Katler & Embury, 1985, Adachi et al., 1990). Demir et al. (2011) fann dock att betydelsen för ett positivt ANA-test vid ITP är oklar i en studie utförd på 87 patienter med ITP och 95 kontroller. De fann en statistiskt signifikant skillnad i ANA-positivitet mellan patienter och kontroller, 13 patienter och tre kontroller var ANA-positiva. Ingen av ITP-patienterna med detekterbara ANA utvecklade SLE under uppföljningsperioden.

Cytotoxicitet

Aktivering av Th2-celler och antikroppsproduktion är det som främst förknippas med ITP (Whitley & Day, 2011), men då PBA endast kunnat påvisas hos cirka 60 % av humanpatienter med ITP (Nugent et al., 2009) och regression av sjukdomen har skett trots påvisade antikroppar (Liu, Hou & Peng, 2013) har det länge misstänkts alternativa mekanismer för trombocytdestruktion vid ITP.

Forskning har visat att cytotoxiska T-celler lyserar kroppsegna trombocyter både in vitro och in vivo. Genom att testa CD3+-celler hos patienter med aktiv ITP, hos patienter med ITP i regression samt hos kontrollpatienter har det setts att cytotoxiska T-celler från vissa ITP-patienter inducerar trombocytdestruktion. Hos patienter med ITP påvisades ett ökat uttryck av gener involverade i cellmedierad cytotoxicitet, bland andra Apo-1/Fas, granzym A, granzym B och perforin jämfört med kontrollpatienter. Hos kroniska ITP-patienter sågs även ett ökat uttryck av gener involverade i Th1-svaret, såsom interferon- γ och interleukin-2 receptor- β jämfört med kontroller (Olsson et al., 2003).

Receptorer på NK-celler, Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR), hämmar NK-cellers och cytotoxiska T-cellers svar genom att binda till Major Histocompatibility Complex (MHC)

klass I, vilket förhindrar lysis av målceller. Olsson et al. (2003) såg hos kroniska ITP-patienter i regression ett ökat uttryck av KIR jämfört med patienter med aktiv ITP.

Komplementkaskaden

Eftersom komplementsystemet och koagulationssystemet är de första i försvaret mot främmande och potentiellt skadliga stimuli har interaktioner mellan de två systemen länge misstänkts. De specifika molekylära signalvägarna av denna interaktion har dock inte kunnat hittas (Mackin, 1995, Amara et al., 2008).

Rollen av komplement i trombocytdestruktion vid IMT hos hund är misstänkt, men inte bevisad (Whitley & Day, 2011). Autoantikroppar kan fixera komplement, vilket kan leda till cell-lysis eller komplement-medierad opsonisering (Lo & Deane, 2014). Ökade koncentrationer av trombocytbundna komplementfaktorer (C3) hittades hos mellan 30 och 70 % av människor med ITP (Lewis & Meyers, 1996). Ingen konsekvent korrelation mellan trombocytantal och komplement har dock detekterats (Mackin, 1995).

DISKUSSION

Att kunna påvisa PBA har i flera studier visat sig vara betydelsefullt för prognosen vid ITP hos människa (Grimaldi et al., 2014, Fabris et al., 2004) och sådana kopplingar har även setts vid IMT hos hund (Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger, 2009, Dircks, Schuberth & Mischke, 2009). I studien utförd av Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger (2009) visade resultaten att hundar med IMT generellt hade lägre trombocytantal än hundar med trombocytopeni av annan orsak. I inklusionskriterierna i denna studie ingick dock att hunden skulle ha både detekterbara PBA och ANA för att få diagnosen IMT. Att både PBA- och ANA-test skulle vara positiva för att hunden skulle klassas som en IMT-hund kan ha gjort inklusionskriterierna för snäva. De skulle även testa positivt på ett Coombs-test, vilket innebär detektion av antikroppar bundna till röda blodkroppar, vilket inte känns relevant. Det framgår inte om det fanns hundar som var positiva för endast PBA, eller endast ANA och hur detta skulle hanterats. Det framgår inte heller om hundarna som diagnosticerades som trombocytopeniska beroende av infektion eller neoplasmi testades för PBA och ANA. Ett annat inklusionskriterie för IMT i denna studie var att hunden skulle visa svar på immunosupprimerande behandling. Då andra studier visat att närvaro av PBA eller ANA kan ge en sämre respons på kortikosteroidbehandling (Berchtold & Wenger, 1993, Abbasi, Milhem & Zaru, 2008), känns det som att Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger (2009) kan ha uteslutit de allvarligaste fallen med IMT ur sin studie genom att ha detta som inklusionskriterie. Det diskuteras inte heller hur tillförlitliga testerna de använt sig av är.

Studier som utförts där trombocytnivåer och ANA-titer jämförts hos ITP-patienter har indikerat att behandling försvåras vid närvaro av ANA. Detta undersöktes bland annat av Abbasi, Milhem & Zaru (2008) som såg signifikant större sänkning av trombocytnivåer hos ANA-negativa patienter jämfört mot ANA-positiva patienter. De reserverar sig dock själva för att de endast hade 41 personer i sin studie, och menar att det behövs fler studier som även inkluderar olika behandlingsmetoder för att kunna säkerställa en koppling, även om resultatet

i denna studie indikerar en koppling. Demir et al. (2011) kunde dock i sin studie inte påvisa någon koppling mellan ANA och behandlingssvar, men de kunde inte heller utesluta den.

Abbasi, Milhem & Zaru (2008) fann att ITP-patienter som testade positivt för ANA visade en sämre respons på steroidbehandling. De menar själva att ANA-testet är en bra hjälp för att avgöra om man tidigt bör fundera på att sätta in annan behandling än steroider tidigt under behandlingstiden. Detta är ett område som också borde utföras fler studier på, och som kanske till och med är ännu viktigare än diagnostiken, eftersom om patienten förväntas svara på behandling spelar en större roll för prognosen än vilken diagnos den har. Det skulle dock ur forskningssyfte och för framtida utveckling av behandling vara intressant om det gick att få fram ett diagnostiskt test för primär IMT/ITP.

Smee, Harkin & Wilkerson (2007) undersökte samband mellan ANA-titer och SLE och SLE-relaterade symptom. I denna studie sågs ett starkt samband mellan hög ANA-titer och SLE, med förutsättning att SLE-relaterade symptom också sågs kliniskt. Bland de hundar som ANA-titer mättes på var trombocytopeni den vanligast avvikande blodbilden, vilket författarna själva påpekar kan ha att göra med att det är svårt att ställa diagnosen IMT. Av dessa hundar var det endast åtta som hade testats för PBA, vilket också förstärker att tilltron till dessa tester inte är särskilt hög.

Även om tester för både PBA och ANA är ospecifika vid diagnosticering av primär IMT/ITP, kan det vara bra att utföra testen om man redan är nästintill säker på sin diagnos utifrån symptom, då de då är ytterligare en indikation på sjukdomen. Dock verkar det mer tydligt att om man redan har en diagnos och även får ett positivt resultat för PBA och/eller ANA är detta korrelerat med en sämre prognos. Trombocytantal och PBA verkar åtföljas omvänt korrelerande och närvaron av PBA och ANA verkar även försvåra behandling. Att svar på immunosupprimerande behandling är ett inklusionskriterie kan också försvåra tolkningen av resultaten. Svårt drabbade patienter kanske inte är mottagliga för behandling och då försvinner de mest "klara" fallen från studier på grund av detta, likt i studien utförd av Botsch, Kuechenhoff & Hirschberger (2009).

Association mellan ITP och SLE, har varit erkänd i årtioden (Abbasi, Milhem & Zaru, 2008), men om denna koppling beror på två olika åtföljande sjukdomar eller om ITP bara är en del av SLE är något som inte alls är klart. Att man finner att patienter med ITP som har detekterbara ANA i högre grad utvecklar SLE senare i livet (Perez, Katler & Embury, 1985, Adachi et al., 1990) borde kunna bero på att trombocytopenin i dessa fall endast är symptom på SLE och inte en ITP. Det behövs generellt ännu mer forskning av betydelsen för både ANA och PBA för primär IMT/ITP, och därigenom även mer sensitiva och framför allt specifika tester för att detektera dem.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Abbasi, S. Y., Milhem, M. & Zaru, L. 2008. A positive antinuclear antibody test predicts for a poor response to initial steroid therapy in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Annals of Hematology*, 87, 459-462.
- Adachi, M., Mita, S., Obana, M., Matsuoka, Y., Harada, K. & Irimajiri, S. 1990. Thrombocytopenia Subsequently Develops Systemic Lupus Erythematosus - Can Anti-SS-A Antibody Predict The Next Event. *Japanese Journal of Medicine*, 29, 481-486.
- Al-Ghazlat, S. 2009. Immunosuppressive therapy for canine immune-mediated hemolytic anemia. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 31, 33...44-33...44.
- Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J. D. & Huber-Lang, M. 2008. Interaction Between the Coagulation and Complement System. *Current Topics in Complement Ii*, 632, 71-79.
- Berchtold, P. & Wenger, M. 1993. Autoantibodies Against Platelet Glycoproteins In Autoimmune Thrombocytopenic Purpura - Their Clinical Significance And Response to Treatment. *Blood*, 81, 1246-1250.
- Botsch, V., Kuechenhoff, H. & Hirschberger, H. J. 2009. Retrospective study of 871 dogs with thrombocytopenia. *Veterinary Record*, 164, 647-651.
- Davidow, E. B., Brainard, B., Martin, L. G., Beal, M. W., Bode, A., Ford, M. J., Ramsey, N., Fagella, A. & Jutkowitz, A. 2012. Use of fresh platelet concentrate or lyophilized platelets in thrombocytopenic dogs with clinical signs of hemorrhage: a preliminary trial in 37 dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 22, 116-125.
- Demir, C., Esen, R., Atmaca, M. & Efe, S. 2011. Prevalence of Autoantibodies Related to Some Autoimmune Disorders in Patients With Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*, 17, E114-E118.
- Dircks, B. H., Schuberth, H.-J. & Mischke, R. 2009. Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004-2006). *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235, 960-966.
- Fabris, F., Scandellari, R., Ruzzon, E., Randi, M. L., Luazzato, G. & Girolami, A. 2004. Platelet-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103, 4562-4564.
- Grimaldi, D., Canoui-Poitaine, F., Croisille, L., Lee, K., Roudot-Thoraval, F., Languille, L., Khellaf, M., Michel, M., Godeau, B. & Bierling, P. 2014. Antiplatelet antibodies detected by the MAIPA assay in newly diagnosed immune thrombocytopenia are associated with chronic outcome and higher risk of bleeding. *Annals of Hematology*, 93, 309-315.
- Kiefel, V., Freitag, E., Kroll, H., Santoso S. & Muellereckhardt, C. 1996. Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Annals of Hematology*, 72, 280-285.
- Lewis, D. C. & Meyers, K. M. 1996. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10, 207-218.
- Liu, X., Hou, Y. & Peng, J. 2013. Advances in immunopathogenesis of adult immune thrombocytopenia. *Frontiers of medicine*, 7, 418-24.

- Lo, E. & Deane, S. 2014. Diagnosis and classification of immune-mediated thrombocytopenia. *Autoimmunity Reviews*, 13, 577-583.
- Mackin, A. 1995. Canine immune-mediated thrombocytopenia - *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 17, 353...364-353...364.
- Neunert, C. 2011. Idiopathic thrombocytopenic purpura: advances in management. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*, 9, 404-6.
- Nugent, D., McMillan, R., Nichol, J. L. & Slichter, S. J. 2009. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *British Journal of Haematology*, 146, 585-596.
- Olsson, B., Andersson, P. O., Jernas, M., Jacobsson, S., Carlsson, B., Carlsson L. M. S. & Wadenvik, H. 2003. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nature Medicine*, 9, 1123-1124.
- Perez, H. D., Katler, E. & Embury, S. 1985. Idiopathic Thrombocytopenic Purpura With High-Titer, Speckled Pattern Antinuclear Antibodies - Possible Marker for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 28, 596-597.
- Putsche, J. C. & Kohn, B. 2008. Primary immune-mediated thrombocytopenia in 30 dogs (1997-2003). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 44, 250-257.
- Semple, J. W. & Provan, D. 2012. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage. *Current Opinion in Hematology*, 19, 357-362.
- Sikorska, A., Konopka, L. & Maslanka, K. 2008. The effect of platelet autoantibodies on the course of the disease and clinical response of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *International Journal of Laboratory Hematology*, 30, 58-64.
- Smee, N. M., Harkin, K. R. & Wilkerson, M. J. 2007. Measurement of serum antinuclear antibody titer in dogs with and without systemic lupus erythematosus: 120 cases (1997-2005). *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230, 1180-1183.
- Whitley, N. T. & Day, M. J. 2011. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *Journal of Small Animal Practice*, 52, 70-85.
- Zimmerman, S. A. & Ware, R. E. 1997. Clinical significance of the antinuclear antibody test in selected children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 19, 297-303.